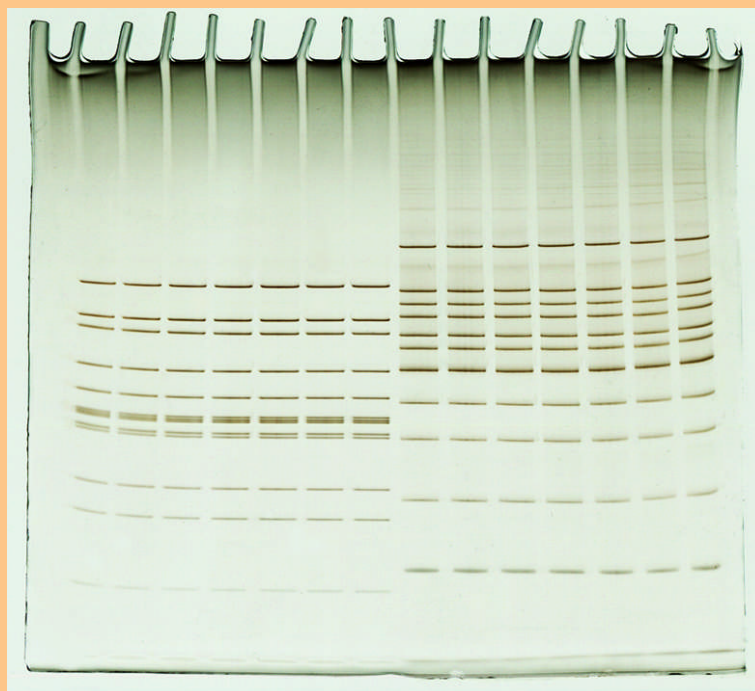
ATTO Technical Manual

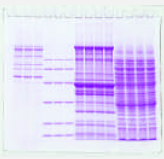
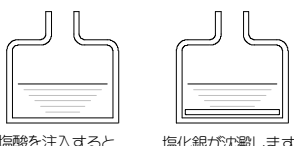
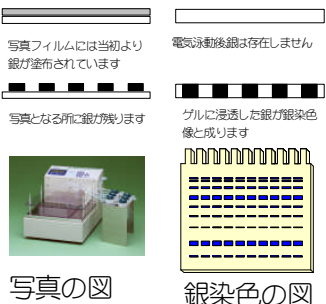
AE-1360型 *EzStain Silver* による

銀染色のコツ

ゲル　：e･パジェル E-T12.5L
試料　：φX174-HincⅡdigests 40ng/ｳｪﾙ
　　　　100bp DNA ladder　125ng/ｳｪﾙ
電極液：トリス･グリシン
通電圧：20mA/枚
銀染色：AE-1360型 ***EzStain Silver***

銀染色ならCBB染色･EtBr染色のの10倍以上の感度があります。

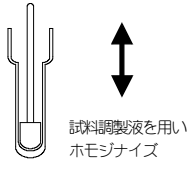
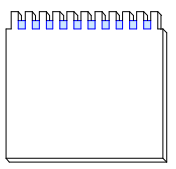
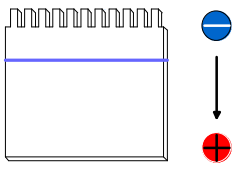
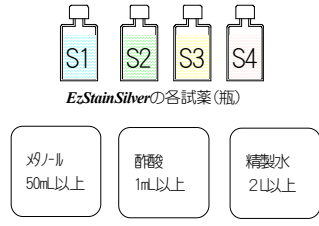
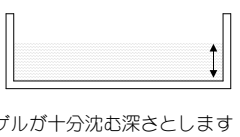
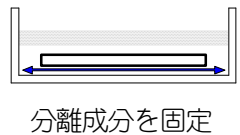
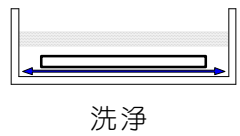
発色開始まで約60分です。

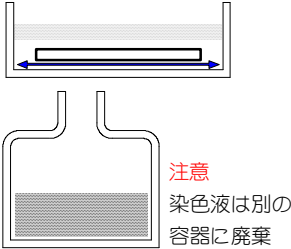
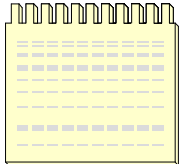
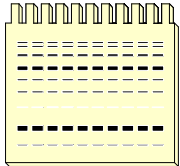
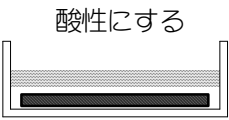
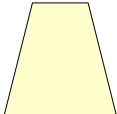
銀染色はタンパク質(MS)･ＤＮＡの検出に利用できます。

ATTO Corporation
3-2-2 Motoasakusa Taitou-ku Tokyo 〒111-0041
TEL 03-5827-4861　FAX 03-5827-6647
URL http://www.atto.co.jp/

ATTO Corporation (Osaka)
2-8-1 Higashi-Tenman Kita-ku Osaka City
〒530-0044
TEL 06-6136-1421　FAX 06-6365-3625

Q1. 銀染色って、どんなもの?	A1. DNAやタンパク質を電気泳動後、銀イオンを用いて検出する技法です。また、この小冊子ではこの方法に限定して説明します。
Q2. 銀染色法の原理は?	A2. 電気泳動分離後、ゲル中に銀イオン溶液を浸透させ、分離された成分と銀イオンを結合させます。次いで、銀イオンを還元すると発色し銀染色像と成ります。銀染色と言っても銀色とはならず、黒味がかった微妙な色調と成ります。
Q3. 銀染色ってどこがいいの?	A3. 銀染色法は高感度、短時間で検出できます。特殊な装置は必要なく、振とう器があればゲルを染色し、これを保存できます。数種の試薬や銀染色キットを用いる事で染色可能です。総合的に優れた染色法と言えます。

銀染色法と他の染色法との比較

	①銀染色	②CBB染色	③リバース染色	④蛍光染色
長所	高感度、短時間、特殊な装置不要、少数の試薬かキット使用、DNA and orタンパク質自体を染色可能。	一定時間以上染料(色素)液に浸漬し、不要色素を脱色するのみであり、操作は比較的容易。	比較的操作容易、CBBより高感度、短時間で終了。	操作容易:一定時間浸けた後、洗浄するのみで終了。高感度・定量性に優れる。
ゲル乾燥保存	○	○	×	×
短所	各反応工程を要し、比較的正確に時間・処方を守る必要がある。また、廃液中の銀イオンを処理する必要がある。	最も一般的に電気泳動像を得る技法だが、やや低感度である。タンパク質試料に対応し、DNAには対応せず。	ゲル乾燥と共に電気泳動像は消失する故、画像処理か写真撮影を要する。金属イオンを別途処理要する。	励起光源を必要とし、画像撮影装置などが必要。浸漬時間は比較的長く、また高感度な蛍光色素は比較的高額である。DNA/タンパク質共用品がない。
ﾀﾝﾊﾟｸ質感度	数ng/バンド	約50ng～1μg/バンド	数10ng/バンド	約10ng/バンド
DNA感度	数10pg/バンド	―	―	約0.1ng/バンド
定量性	×	△	×	○
染色像				

Q4. それで、結局の所、銀染色法が一番良いという事か?	A4. 銀染色法は各成分に対し、非特異的に高感度に染色する技法です。操作性も良好であり、総合的に優れた染色法といえます。但し、特異的染色と濃度定量は不得手です。
Q5. 銀染色技法も多種多様な方法があるそうだが・・・	A5. 銀染色法は僅かな変法まで含めると、無数にあると言えます。各状況により最適な銀染色法がありますが、各々を試行錯誤して選定する事は困難です。その為、汎用的な銀染色キットが利用されています。
Q6. ***EzStain Silver*** も、コツとか工夫する点があるでは・・・?	A6. コツや工夫よりもまず取扱説明書の通りにご使用下さい。***EzStain Silver***は感度や操作性が最良の結果となるように作製されています。独自に変法なされると良好な結果を得られない場合があります。

Q7. 銀染色後の銀イオン廃液はどのように処理するのか?	塩酸を注入すると　塩化銀が沈殿します	A7. 銀イオン廃液に塩素イオン(HCl、NaCl)を加え塩化銀として沈澱させます。上澄みは(NaClを加えた場合は中和後)、希釈して排液し、塩化銀の沈澱は濾過後、別途処理(専門業者への引渡し等)します。
Q8. 銀染色と写真現像と違うのか?	写真フィルムには当初より銀が塗布されています　電気泳動後銀は存在しません　写真となる所に銀が残ります　ゲルに浸透した銀が銀染色像と成ります　写真の図　銀染色の図	A8. 銀染色と写真現像の類似点は銀イオンを還元して金属銀とする点です。写真フィルムには予め銀が塗布されており、現像・定着により不要の銀を除去して写真像とします。しかし銀染色の場合、当初より銀はなく、電気泳動後銀イオンをゲル中に浸透させタンパク質やDNAと結合させた後、銀イオンを還元して、銀染色像とします。銀染色というよりも、「銀メッキ」と言ったほうが正しいかも知れません。
Q9. ゲル内の尿素やグリセロールの影響を受けるのか?	電気泳動後のゲル固定時間を30分間とします。	A9. 尿素やグリセロールがゲルに含まれていると、銀染色され難く成ります。その為、本来の固定時間10分を30分間に延長します。
Q10. DNA試料や泳動バッファーにEDTAが入っていると影響を受けるか?	取扱説明書通りに操作すれば、殆ど影響有りません。	A10. EDTAの影響は有りますが、固定・洗浄過程で殆ど除去されます。
Q11. 試料溶液中にDTTが入っていると影響を受けるか?	取扱説明書に記載のとおり操作してください。	A11. DTTが含まれているとその周囲のバックグランドが染まらないことがあります。洗浄をメタノール溶液にすることで除去されます。
Q12. 検出後、質量分析(MS)を行なうが問題ないか?	使用可能です。	A12. 銀染色処方にグルタルアルデヒドが含まれていると質量分析結果に影響を及ぼす事が有ります。*EzStain Silver*には含まれていません。
Q13. 染色後の銀を取りたい(脱色したい)が可能か?	ＫＩ溶液で洗浄することで再溶解可能です。	A13. 6M KI(ヨウ化カリウム)溶液で色が抜けるまで脱色します。液交換3回/2時間ぐらいで透明になります。

銀染色キット各社比較

(2013年各社カタログ表記に基づきます)

製品	アトー *EzStain silver*	B社	L社	T社	C社	W社	N社
感度 (ﾀﾝﾊﾟｸ質)	数ng	0.6～1.2ng	0.2～0.6ng	0.25ng	数ng	0.6ng	数ng
ｷｯﾄ内容	4	6	7	6	6	7	4
ｽﾃｯﾌﾟ数	8	3		9		9	9
時間	約60min	約120min	約120min	約40min	約60min	約70min	約80min
対応(ﾐﾆｹﾞﾙ)	50枚	40枚	20枚	20枚	10枚	20枚	20枚
価格	¥16,000	¥34,000	¥29,100	¥35,000	¥9,000	¥19,000	¥9,500
単価/ﾐﾆｹﾞﾙ	¥320	¥850	¥1,450	¥1,750	¥900	¥950	¥475
特徴	MS可、操作性、安価	アガロースも可	MS可	MS用	二重染色可	MS用	MS可、核酸不可

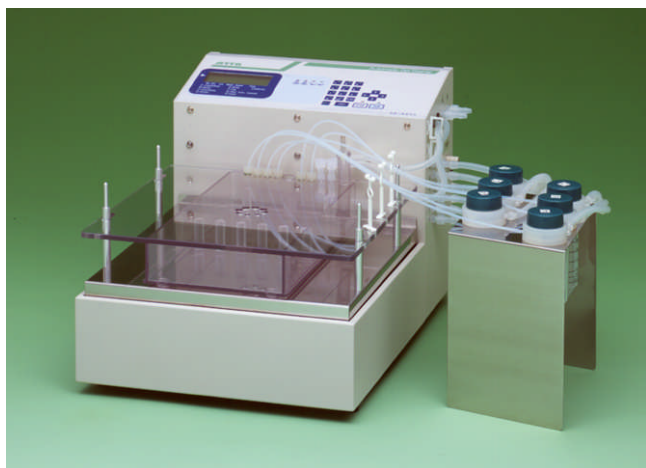
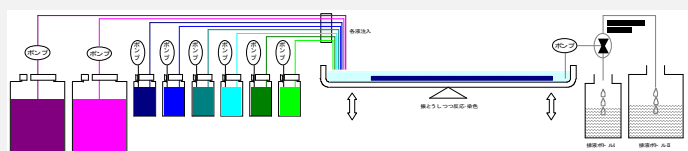
AE-1360 型 *EzStain Silver*

工程名	図解	使用方法要点
1. 電気泳動 ①試料調製	試料調製液を用い ホモジナイズ	1. 電気泳動 ①試料調製は電気泳動の全てを決定します。試料調製が不適切であれば、良好な電気泳動像は全く期待できません。試料調製にはアトー㈱AE-1430型サンプル調製用バッファーキット品***EzApply***を推奨致します。
②電気泳動試料添加		②試料添加量 幅4.2mmのウェル(アトー㈱eパジェル14検体用など)ならばDNAで5ng程度、タンパク質で500ng程度の範囲内とします。
③電気泳動・通電		③取扱説明書通りに操作し、電気泳動します。
2. 銀染色温度に注意		2. 環境温度25℃±3で操作します。 実験室の温度は一般に、この範囲内と想定しています。
3. 容器と試薬を準備し、溶液調製	S1 S2 S3 S4 *EzStainSilver*の各試薬(瓶) メタノール 50mL以上 酢酸 1mL以上 精製水 2L以上	3. 試薬準備、溶液調製 ①***EzStain Silver***一式 ②ゲルよりも一回り大きいプラスチック容器(台所用品　など透明ないし白色の蓋付容器が良好) ③特級メタノール50mL以上(固定液調製用) ④酢酸1mL以上　　　　　(停止液調製用) ⑤精製水(蒸留水以上)2L以上
4. 一般的注意点 工程時間・手袋	実験用手袋着用厳守	4. 一般的注意事項 取扱説明書通りに実験して下さい。***EzStain Silver***は最短時間・最小作業で最良の銀線染色像を得るように作製されていますので、工程時間はできるだけ正確に守って下さい。
5. 銀染色操作 ①電気泳動終了前に、『固定液』を準備します。	ゲルが十分沈む深さとします	5. 銀染色操作 ①『固定液』で分離成分をゲルに固定し、且つ銀染色に不要な成分を除去します。ミニゲルより一回り大きい程度の容器なら、80～100mL注入すればゲルが十分沈む深さとなります。
②電気泳動後のゲルを『固定液』に入れ、10分間振とうし排液します。	分離成分を固定	②振とう強度(速度)は強すぎるとゲルを損ない、弱すぎるとゲルに均等に溶液が浸透しません。ゲルがトレイの底に付着せずゆっくり滑り動いている程度が最適です。 シーソー式や水平往復式の振とう器の使用を推奨します。
③精製水で10分間振とうしつつ3回洗浄します。 (試料溶液にDTTを含む場合はメタノール溶液を用います。)	洗浄	③「精製水での洗浄」という工程は、一見特筆すべき工程では無いようですが、極めて重要な工程です。この工程でゲル内やゲル表面の不要な成分を洗浄除去します。この際、『精製水』が清浄でなかったり、洗浄不十分であると、電気泳動像の汚れと成ります。逆に長すぎると感度が落ちる場合があります。試料処理液にDTTを含む場合、バックグランドが染まり難い(むらになる)ことがあります。その際はメタノール溶液を用います。(詳細は取扱説明書参照)

使用方法の要点

④『染色液』中で5分間振とうし、排液します。但し、この溶液はそのまま下水に排液できません。	注意 染色液は別の容器に廃棄	④固定液と同様に振とうします。『染色液』には銀イオンが含まれているので、そのまま下水に排液できません。別容器に移し塩素イオン(HCl、NaCl)を加え塩化銀として沈澱させます。HCLなら約150μL、NaClなら約100mg必要です。上澄みは(NaClは中和後)、希釈して排液し、塩化銀の沈澱は別途処理します。各施設、自治体等の指導に従って下さい。
⑤ゲル表面の過剰な銀イオンを除去します。 約30秒間でゲルに精製水を100mL注入・振とう・排液します。	イメージ図: 着色はしていません。	⑤*EzStain Silver*での銀染色で最も繊細な工程です。 この工程を省略すると過剰な銀イオンを除去できず、良好な電気泳動像を得られません。精製水注入・振とう・排液終了までを約30秒間で行なって下さい。この時間を厳守しないと、必要な銀イオンは流れ去り、場合によっては電気泳動像が得られない場合もあります。 その後、直ちに、下記の『発色液』を注入します。
⑥『発色液』を注入し、30秒間振とうし、排液します。共洗い操作です。		⑥上述⑤の操作終了後直ちに、『発色液』を注入し、30秒間振とうし迅速に排液します。この間、淡く銀染色像が出現する事がありますが、稀です。この工程により『発色液』への液交換を確実にします。
⑦再度『発色液』を注入し、適切な銀染色像となるまで振とうし、排液します。		⑦各状況により適切な銀染色像となるまでの時間は異なりますが、概略10～20分です。 **30分経過しても痕跡も出現しない場合、銀染色工程のいずれかが不調です。この場合、決してゲルを捨てず、この溶液に浸けたまま、翌日まで放置して下さい。背景は薄茶系となりますが、銀染色像は出現します。 ***それでも像が出現しない場合は、試料調製不良、添加量過少、など銀染色以前の操作に起因する可能性があります。
⑧『停止液』100mLを注入し、10分間振とうし、排液します。	酸性にする	⑧適切な銀染色像となった後、上述『発色液』を排液し、『停止液』を注入します。銀染色に熟練してきたならば、適切な銀染色像となる一歩手前で、『停止液』に交換します。厳密には『停止液』に交換しても多少銀染色像(発色)が進行します。
⑨精製水100mLで5分間振とうし排液します。 もう一度繰り返します。		⑨『精製水』を用いて、停止液を洗います。この操作もう一度繰り返します。
⑩電気泳動像を記録します。 画像取込や写真撮影、乾燥後ゲル保存などです。		⑩ゲルを乾燥すると、不均一に収縮して、乾燥前の形状と多少異なります。その為、乾燥前に画像撮影などして記録します。
⑪ゲルを乾燥して記録保存する場合	やや変形した乾燥ゲル(図は強調してあります)	⑪低濃度(7.5%以下)のゲルならば銀染色後、そのまま乾燥してもゲルに亀裂は殆ど生じませんが、それ以上のゲル濃度となると、亀裂が生じ易くなり、これを防ぐには、35%メタノール溶液に浸け、2～3回液交換した後、一夜浸漬すると、翌日ゲルは収縮して乾燥時の強度を増します。しかし、多少変形してしまいます。亀裂防止剤AE-3780型アンタイクラックの使用を推奨します。

EzStain Silver の銀染色操作を自動運転

1. 銀染色は有用な染色法ですが、工程は少なくないです。さらに多数枚のゲルに対しては?	90分 + 90分 + 90分 + 90分 + 90分 90分×5＝7.5時間	1. 度重なるとちょっと大変ですね。 *EzStain Silver*によれば、溶液調製も容易であり、溶液調製から銀染色完了まで、約90分で終了します。しかし、連日多数回銀染色するとなると･･･、 そこで ⇩
2. 装置を用い自動化できないか?	⇨	2. アトー㈱ではAE-6630型多用途自動染色装置を発売中です。 この装置を｢染次郎｣と呼んでください。

染次郎の概要

染次郎の外観･概要を左と上に示します。装置の動作としては、各溶液給液(注入)、排液、ゲルを入れたトレー振とうを｢組合わせたものです。ONすれば、6種の溶液を各々順次、或は同時に給液(注入)･振とう･排液し銀染色を終了します。

自動染色装置 染次郎の仕様･特長

1. 型式･名称	AE-6630型 多用途自動染色装置	｢染次郎｣と呼んで下さい
2. 溶液数	8種類(2Lボトル2本、35mLボトル6本)	35mLボトルに原液を入れ、工程中に希釈する設定とします。*EzStain Silver*なら5種類のボトルを使用します。
3. ポンプ	給液ポンプ8台、排液ポンプ1台内蔵	各ポンプは独立故、溶液の相互混合はありません。同日同一条件なら、その都度ボトルを洗浄する必要はありません。
4. 対応ゲル･枚数	ミニスラブ(90×80mm)2枚 他の寸法･枚数は、別売品トレーで対応	一般に、既製ゲルはミニスラブ寸法であり、また電気泳動直後に銀染色するので、2枚用のトレイが適切です。大(4枚用)は小(2枚用)を兼ねず、溶液量を増します。
5. 振とう速度	1～7の速度段階に設定	3～4程度で使用します。
6. ファイル数	20ファイル	20ファイルを越えて設定できませんが、その際、御用済みのファイルを上書きして下さい。
7. 設定済みファイル	*EzStain Silver*･*EzStain Reverse*･洗浄用	工場出荷時より、左記キットおよび装置使用後の配管洗浄ファイルが設定済みです。
8. ステップ数	48ステップ (最長9時間59分59秒/ステップ)	各銀染色法がありますが、多くても20ステップ程度です。*EzStain Silver*の場合17ステップです。
9. 排液分岐機構 (別売品で対応)	別売品の排液分岐バルブにより排液を2系統に分離して廃液	銀染色では銀イオンを用いますので、そのまま下水に排液できません。別流路に銀イオンを含む溶液だけ導き、廃液容器に集め、処理します。
10. 電源	AC100V 50/60Hz 60W	
11. 外寸法･質量	幅×高×奥行＝280×260×406mm 8.8kg	

手作業と染次郎とを比較

自動運転－染次郎でどの程度、時間を節約できるのか？

	手動操作の場合	染次郎の場合
全反応時間	手動・自動殆ど差なし	
銀染色法	AE-1360型*EzStainSilver*を用いる場合	
自動染色装置		『染次郎』

銀染色キットEzStainSilverによる銀染色工程

	各工程	各溶液	容量	工程時間
1	固定	『①液(固定液)』	100mL	10分間
2	洗浄	精製水		10分間×3回
3	染色	『②液(染色液)』		5分間
4	洗浄	精製水		30秒間
5	前発色	『③液(発色液)』		30秒間
6	発色	『③液(発色液)』		10～20分間
7	停止	『④液(停止液)』		10分間
8	洗浄	精製水		5分間×2回

染次郎の場合：工程内容・時間は、手動・「染次郎」とも殆ど同様です。工程時間短縮はできませんが、工程中は器械が運転し、溶液注入、振とう、排液工程を進みます。

	手動操作の場合	染次郎の場合
銀染色一回に要する時間	銀染色工程時間を単純に合計すると、約80分間となります。手動・『染次郎』とも、溶液注入、排液時間などがありますので、これを含めて90分とします。	
空き時間	10分間という工程もあり、空き時間は有ります。しかし、次の工程までの時間を厳守しなければならず、空き時間での作業は限定されます。	工程中は、全て空き時間です。1日の運転回数が多いほど、手動作業との差は開きます。
5回連続して銀染色する場合	1日に5回銀染色すると、5回×90分間＝450分間＝7.5時間を要します。その間、断片的な空き時間は有りますが、本来の研究には、専念困難のようです。	「染次郎」を用いても反応時間は同様です。各回の始めと終わりに断続的に5回の手作業はありますが、それ以外の時間は空きます。断続的とはいえ少なくとも6時間以上の空き時間が生じます。
手動・自動との総合的比較	電気泳動関連の全時間からみれば、銀染色工程は一部です。たまに銀染色するならば、手動作業の方が却って有利です。しかし、一日に多数回銀染色する場合や、連日に亘ると、銀染色は負担が大き過ぎます。	たまに銀染色するならば必ずしも「染次郎」を用いる必要はありません。しかし「染次郎」は自動染色装置である為、*EzStain Silver*と組合せれば、操作経験を問わず、銀染色像は再現性をもたらします。特に、多数枚のゲルを銀染色する際、「染次郎」は大いに活躍します。

時間節約の収支

①手作業で1日5回銀染色すると、その日は銀染色だけに終始します。
②「染次郎」を用いれば、各回の始めと終わりだけの操作だけで済みます。
③一箇月に1回程度銀染色するならば、時間・労力とも手作業でも対応できます。
④短期間に大量枚数を銀染色する場合や、一日数回でも連日続く場合、時間・労力とも負担が大きいと言えます。染次郎は(ルーチン)日常検査的に、使用する際、有用な装置と成ります。

銀染色キット *EzStain Silver* の特長

1. 型式・名称	AE-1360型 ***EzStain Silver***	Ezシリーズの銀染色キットです
2. 発色開始時間	60分後程度	操作開始から短時間(約60分後)で発色します。
3. 対応電気泳動法	各種電気泳動法に対応	ポリアクリルアミドゲルによる各種電気泳動方に対応します。 SDS-PAGE、native-、等電点-、二次元-電気泳動法などに対応。
4. 対応試料	タンパク質、DNA	タンパク質やDNA、或は両方同時に銀染色できます。
5. 感度	タンパク質: 数ng/バンド DNA: 数10pg/バンド	銀染色として十分な感度
6. 操作性	100倍希釈に統一	原液:精製水=1mL:100mLと100倍希釈に統一してある為、誤操作を防ぎ、且つ、メスシリンダーなど器具を単純化できます。
7. 臭気性成分不含	アンモニア含まず	成分にアンモニアを含まず、キット原液は殆ど無臭です。
8. 銀アミド生成せず	廃液に爆発性物質生成せず	爆発に関し配慮する必要はなく、負担軽減されます。
9. 少ない工程数	8工程数	各社キットと比較しても少ないといえます。
10. 質量分析対応	グルタルアルデヒド不含	銀染色後、質量分析(MS)に対応できます。
11. 銀染色像停止時期	緩やかな発色、約15分間で飽和	緩やかに発色しますから、銀染色停止時期に神経質になる必要はありません。15～20分で電気泳動像は一定となります。
12. MSDS関連成分	硝酸銀、水酸化ナトリウム、ホルムアルデヒド	MSDSはアトー㈱ホームページに掲載。 http://www.atto.co.jp
13. 価格	¥16,000/ミニゲル50枚	リーズナブル　¥320/ゲル

関　連　製　品

分子量マーカー　AE-1440型 ***EzStandard***(イージースタンダード)

製品の仕様

キット形状	調製済タンパク質溶液、即使用可能
キット内容	6種類のタンパク質 (97,200、66,400、45,000、29,000、20,100、14,300Da)
内容量	500μL: 約160ウェル分
有効期間	-20℃で約1年間
価格	**¥9,800(1本)、¥19,000(2本組)**

製品の特長

- 各1万円を切って登場!
- 各バンドがシャープ
- 保存安定性にに自信あり
- 調製済みなので注入添加するだけ

試料調製用キット　AE-1430型 ***EzApply***(イージーアプライ)

製品の仕様

調製後成分	トリス-塩酸緩衝液、2%SDS、20%スクロース、BPB 100mM DTT(ジチオトレイトール)
キット形状	DTT詰容器5本+EzApply溶液詰容器1本
使用方法	(DTT+EzApply溶液):試料=1:1に混合
有効期限	(DTT開封前)-20℃で6ヶ月
価格	**¥6,800**

製品の特長

- キット化した試料調製用溶液と試料を混合するだけで、試料調製完了
- 還元剤にDTT(ジチオトレイトール)を採用
- 2-メルカプトエタノールより還元反応が確実、擬似バンドの出現が少ない、臭気が少ない

泳動バッファー　AE-1410型 ***EzRun***(イージーラン)

製品の仕様

型式名称	AE-1410型 ***EzRun***
キット形態	粉末混合物　10L分
使用方法	内容物を精製水1Lで溶解(10倍濃度溶液)
終濃度	25mMトリス+192mMグリシン+0.1SDS
有効期間	粉末状態で室温2年、溶解して室温6個月
価格	**¥4,800**

製品の特長

- SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に対応
- 1袋で十分量
- 精製水に溶解するだけの簡単調製
- お好みの容量・濃度に調製可能
- 粉末なので場所をとらず、長期保存OK

リバース染色キット　AE-1310型 ***EzStainReverse***(イージーステインリバース)

製品の仕様

キット形状	R-1、R-2 各溶液500mLをポリエチレン容器詰
主成分	①R-1溶液(イミダゾール、ドデシル硫酸ナトリウム) ②R-2溶液(硫酸亜鉛)
適用枚数	90×80×1mmゲルで50枚
保存	室温遮光保存
価格	**¥16,000**

製品の特長

- バックグラウンドが染色されるため、目的バンドを切り出し、タンパク質成分を回収可能
- 染色は20～25分と短時間で終了
- 感度はCBB染色の10倍
- ゲル切出し後の回収キットを取揃え

CBB染色溶液　AE-1340型 ***EzStainAQua***(イージーステインアクア)

製品の仕様

キット形状	CBB染色溶液1L/ポリエチレン容器詰
主成分	CBB溶液
適用枚数	90×80×1mmゲルで20枚
保存	室温遮光保存
価格	**¥9,800**

製品の特長

- メタノール、有機溶媒フリー　水で脱色
- 酢酸フリー　無臭
- Ready to use (調製不要)
- バックグラウンドが透明
- 電子レンジ法でクイック染色可能

※上記ご紹介製品の他にも電気泳動用試薬、ウエスタンブロッティング用試薬等多数揃えております。
詳しくはHPをご覧いただくかカタログをご請求ください。

2013/5/1

アトー株式会社
生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器　開発/生産/販売/サービス
■本　社　〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2　TEL 03-5827-4861　FAX 03-5827-6647
■大阪支店　〒530-0044 大阪市北区東天満2-8-1 若杉センタービル別館 5F　TEL 06-6136-1421　FAX 06-6365-3625
■URL http://www.atto.co.jp　■本社 e-mail : info@atto.co.jp